

病(AD)、慢性间歇性缺氧导致的认知障碍和学习障碍^[13]。同时在本次研究中,维生素E可以改善DEHP对小鼠学习记忆能力造成的损伤,这表明维生素E对DEHP引起的神经行为的改变有保护作用。

机体在正常生理过程中会产生一系列的活性氧自由基分子,而机体本身具有助氧化系统和抗氧化系统。在正常的生理条件下,这两个系统保持动态平衡,使机体内的活性氧维持在较低的水平。从实验结果来看,DEHP或其代谢产物可能通过干扰小鼠体内抗氧化酶基因的表达或抑制其活性等未知的方式干扰机体内活性氧的代谢过程,使机体产生过量的ROS,而过量的ROS可进一步引发脂质的过氧化作用,产生MDA等脂质过氧化物,这个实验结果与王蕊等^[14]的研究结果一致。实验还显示在一定程度上维生素E能够清除脑组织中的氧自由基,降低脂质的过氧化程度在脂质的过氧化程度,对DEHP诱导的氧化损伤有保护作用。脂质的过氧化可影响生物体尤其是大脑中海马组织区膜系统的正常功能,从而干扰神经信号的传导,影响线粒体的正常供能,进而影响小鼠的学习记忆能力。

综上所述,DEHP能导致小鼠学习记忆能力下降同时诱发脑组织的氧化损伤,维生素E作为抗氧化剂可保护DEHP所造成的氧化损伤及其所致的学习记忆能力的下降,由此我们初步判断DEHP引起学习记忆能力降低的机制可能涉及到了氧化损伤。此外,虽然小鼠与人类的代谢方式及学习记忆方式有所不同,但是人们对DEHP的这种生物毒性也应当引起充分的注意,以防DEHP对人体健康造成不利的影响。

参考文献

1 Giuseppe L. Monitoring phthalate exposure in humans [J]. Clinica

Chimica Acta, 2005, 361(1-2): 20-29

- 2 张蕴晖. 邻苯二甲酸二乙基己酯对环境和生物体的危害[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(2): 29, 73-77
- 3 陈如, 蒋晓琪, 王建平. 邻苯二甲酸酯及其生态毒性[J]. 印染助剂, 2010, 27(9): 27, 52-56
- 4 王黎明. 邻苯二甲酸二乙基己酯对小鼠遗传毒性和免疫毒性的研究[D]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2007, 41(3): 440-443
- 5 Toyohito T. Reproductive and neurobehavioral effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in a cross-mating toxicity study of mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(4): 581-589
- 6 胡存丽, 仲来福. 邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯遗传毒性研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2007, 29(3): 185-190
- 7 Dzhokova-Stojkova S, Bogdanska J, Stojkova Z. Peroxisome proliferators: their biological and toxicological effects [J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2009, 39(6): 468-474
- 8 王维刚, 周嘉斌, 朱明莉, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(一)——Morris水迷宫实验在小鼠表型分析中的应用[J] 中国细胞生物学学报, 2011, 33(1): 8-14
- 9 聂金雷, 时庆德. 利用荧光探针直接测定线粒体活性氧的形成[J]. 中国应用生理学杂志, 2002, 18(2): 196-198
- 10 Tandon V, Gupta RK. Effect of Vitex negundo on oxidative stress [J]. Indian J Pharm, 2005, 37(1): 38-40
- 11 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 2版, 北京: 北京高等教育出版社, 1990: 102-104
- 12 Gilioli R, Bulheroni C, Terrana T, et al. A transversal and longitudinal neurological study of a working population engaged in the production of phthalates [J]. Med Lav, 1978, 69(5): 620-631
- 13 Joseph JA, Shukitt-Hale B. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits [J]. The Journal of Neuroscience, 1992, 18(19): 8047-8055
- 14 王蕊, 季厚勇. DEHP对大鼠脂质过氧化反应的影响[J] 中国公共卫生, 2001, 17(11): 1011-1012

(收稿: 2011-08-28)

(修回: 2011-09-05)

四川省 106 株结核分枝杆菌 spoligotyping 基因分型研究

杨 筠(jun) 董海燕 李定越 刘志广 陈 建 杨 筠(yun) 龙 波 万康林

摘 要 目的 了解四川省结核分枝杆菌基因型构成情况以及北京基因型菌株在四川省结核分枝杆菌中所占的比例, 为四川省结核病预防控制提供分子流行病学依据。**方法** 采用间隔区寡核苷酸分型(spacer oligonucleotide typing, spoligotyping)方法

基金项目: 国家“十一五”重大专项基金资助项目(2008ZX100/03-010-02); 四川省科技厅基金资助项目

作者单位: 610041 成都, 四川省疾病预防控制中心(董海燕、刘志广、万康林); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、传染病预防控制国家重点实验室[杨筠(jun)、李定越、杨筠(yun)、龙波]; 成都医学院(陈建)[注: 杨筠(jun)和董海燕为共同第一作者]

通讯作者: 万康林, 电子信箱: wankanglin@icdc.cn

对 106 株四川省结核分枝杆菌进行分型分析,将 spoligotyping 分型结果与 SITVIT2 数据库进行比较确定菌株的基因家族。结果根据 spoligotyping 分型结果及与数据库 SITVIT2 的比较,106 株结核分枝杆菌表现为 30 种基因型,21 种基因型为数据库中存在的基因型,9 种基因型为新的基因型。基因家族分析发现,65 株结核分枝杆菌为北京家族菌株(61.32%),26 株为 T 家族菌株,4 株为 MANU 家族菌株,U 型及 H 型家族菌株各 1 株。9 株新基因型的菌株没有进行基因家族的确定。结论 本研究对四川省结核分枝杆菌的基因型构成以及北京家族菌株的流行程度做了初步的描述。对四川省结核病的流行趋势分析、结核病的预防控制等具有重要的意义。

关键词 结核分枝杆菌 间隔区寡核苷酸分型 北京家族

Genotyping of *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates in Sichuan Province with Spoligotyping. Yang Jun, Dong Haiyan, Li Dingyue, Liu Zhiguang, Chen Jian, Yang Yun, Long Bo, Wan Kanglin. CDC of Sichuan Province, 610041 Sichuan, China

Abstract Objective To study the population of *mycobacterium tuberculosis* and the prevalence of Beijing genotype strains in Sichuan Province, and to provide the molecular epidemiological evidence for prevention and control of tuberculosis in Sichuan. **Methods** A total of 106 *mycobacterium tuberculosis* isolates from Sichuan province were genotyped by Spoligotyping and the Spoligotyping results were compared with the SITVIT2 database. **Results** The Spoligotyping results showed that thirty spoligotypes were identified; 21 spoligotypes had shared international type number in the database and the other 9 spoligotypes were novel. Family assignment revealed that the most frequent strains were Beijing family strains (61.32%) followed by T family (24.53%), MANU family (3.37%). In addition, the strains belonged to H family and U family were also found in Sichuan province. **Conclusion** This study provides preliminary insight into the population structure of *mycobacterium tuberculosis* circulating in Sichuan province as well as the prevalence of Beijing family strains in this area. It is important for the prevention and control of tuberculosis in Sichuan province.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; Spoligotyping; Beijing family

分子流行病学是研究传染病传播的有效手段,其在结核病基因分型中的应用,与传统的流行病学相比,能够更准确地预测疾病的暴发流行及其传播模式。此外,基因分型方法还可用于结核分枝杆菌菌株之间的遗传学关系研究。结核病的分子流行病学研究结果显示,目前全世界的结核病流行主要是由几种特殊的结核分枝杆菌家族引起,如北京家族、T 家族、CAS 家族等以及其他未定名的菌株群。并且不同的基因家族可能具有不同的分子特征、地区性分布以及致病性。因此研究结核分枝杆菌的基因型构成和主要流行菌株对结核病的分子流行病学监测具有十分重要的意义。

间隔区寡核苷酸分型(spacer oligonucleotide typing, spoligotyping)方法是一种以 PCR 为基础的检测结核分枝杆菌菌株 DNA 中的直接重复区(direct repeat, DR)的基因分型方法。该方法简便、快速、重复性高,是目前使用最频繁的结核分枝杆菌 PCR 分型方法^[1,2]。并且目前已经建立了国际上的 spoligotyping 基因分型数据库 SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo>),该数据库目前包含 141 个国家的 39295 株结核分枝杆菌的 spoligotyping 分型结果,可供研究人员进行比对。利用 spoligotyping 结果分析结核分枝杆菌,发现不同的结核分枝杆菌菌株常具有相同的 spoligotyping 结果,例如,北

京家族菌株常具有缺乏 1~34 间隔序列的特性,基于这些特性,可用 spoligotyping 方法快速鉴定北京家族菌株及其他具有特征性的家族菌株^[3,4]。

为了解四川省结核分枝杆菌的基因型构成,以及北京基因型菌株在四川省结核分枝杆菌中所占的比例,本研究从四川省结核病防治所收集了 106 株结核分枝杆菌菌株,采用 spoligotyping 基因分型方法进行分析,并将 106 株结核分枝杆菌的 spoligotyping 结果与数据库 SITVIT2 进行了比对分析。

材料与方法

1. 实验菌株:106 株结核分枝杆菌由四川省疾病预防控制中心提供;结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 和 BCG 购自中国食品药品检定研究院。

2. 主要试剂:2 × PCR 预混液(北京康为世纪生物技术有限公司);引物(上海生工生物工程技术有限公司);Biodyne C 膜(Pall Biosupport 公司);streptavidin - peroxidase conjugate 酶和 CDP - star 检测液(GE 公司)。

3. DNA 提取:取一菌环 L-J 培养基斜面上生长的结核分枝杆菌,置 400 μl TE 缓冲液中悬菌,沸水浴 15 min,12000 r/min 离心 5 min,取上清即为模板 DNA, -20℃ 保存备用。

4. spoligotyping 分型:根据 Kamerbeek 等^[2]建立的 spoligotyping 标准方法对 106 株结核分枝杆菌进行分型,即用引物 DRa 和 DRb 扩增结核菌株的 DR 区,再将 PCR 产物与固定有 43 个间隔区寡核苷酸探针的杂交膜进行杂交。实验中以 H37Rv 和 BCG 作为阳性对照,蒸馏水作为阴性对照。

结 果

H3TRV	ROG	BLANK
SC06067		
SC06068		
SC06069		
SC06070		
SC06071		
SC06075		
SC06076		
SC06077		
SC06078		
SC06079		
SC06081		
SC06083		
SC06084		
SC06085		
SC06088		
SC06089		
SC06090		
SC06099		
SC06100		
SC06101		
SC06102		
SC06103		
SC06105		
SC06106		
SC06107		
SC06109		
SC06111		
SC06112		
SC06113		
SC06114		
SC06116		
SC06117		
SC06118		
SC06119		
SC06120		
SC06125		
SC06129		
SC06135		

表1 四川省106株结核分枝杆菌 spoligotyping 分型结果

[illegible]

讨 论

北京家族菌株于1995年由 Van Soolingen 等首次报道,具有特征性的 spoligotyping 指纹图谱,即1~34间隔区缺失^[5]。目前,已经在世界范围内发现了北京家族菌株的流行,尤其是在中国、日本、东南亚和俄罗斯等国家和地区,北京家族菌株为主要的流行菌株^[6~8]。北京家族菌株是源于共同祖先的后代菌株,具有一定的选择优势,易呈克隆传播,在结核分枝杆菌种系中构成一个大的分支。据 SITVIT2 数据库统计的结果显示,在东亚50%以上的结核分枝杆菌为北京家族菌株,而且北京家族菌株已达到全球分离结核分枝杆菌的13%,全球约有1/3的结核病都是由北京家族菌株引起的。本研究中,北京家族菌株在四川省结核分枝杆菌中的比例为61.32%,为四川省的主要流行菌株。所以在制定结核病的预防控制措施时应该重点加强对北京家族菌株的流行病学监测。

T 家族菌株是本研究中发现的第 2 大流行菌株, 尽管在世界范围内也发现了 T 家族菌株的流行, 但是该家族的菌株不像北京家族菌株那样具有高度的基因保守性, 而是具有很高的遗传异质性, 没有很明确的 spoligotyping 指纹图谱特征, 并且到目前为止也没有明确的定义^[9,10]。提示应该寻找其他的遗传标志

物以加强对该家族菌株的进一步研究。T 家族菌株是欧美地区的主要流行菌株,其在四川省的流行可能与近年该地区与欧美之间的贸易旅游比较频繁有关。

此外本研究中还发现了 4 株 MANU 家族结核分枝杆菌(3.77%)。MANU 家族菌株于 2004 年在印度首次报道,随后在其他一些国家和地区也发现了该基因家族的菌株,如马达加斯加岛、南非以及波兰等^[11]。SITVIT2 数据库中关于 MANU 基因家族(33~34 间隔区缺失)的菌株信息很少,仅占 0.4%。由于 MANU 家族为古典型的结核分枝杆菌,因此 MANU 家族菌株的发现对研究结核分枝杆菌的遗传进化具有重要的作用。

总之,本研究对四川省结核分枝杆菌的基因型构成及主要流行菌株的流行情况进行了初步描述,北京家族菌株为四川省的主要流行菌株,但同时还存在 T 家族菌株、MANU 家族菌株等其他家族的结核分枝杆菌。这对四川省结核病的流行趋势分析等具有重要的意义。

参考文献

- 1 Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, *et al.* Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method [J]. *Mol Microbiol*, 1993, 10(5):1057-1065
- 2 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4):907-914
- 3 Tounghousssova OS, Sandven P, Mariandyshev AO, *et al.* Spread of drug-resistant *mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing geno-

- type in the Archangel Oblast, Russia [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(6):1930-1937
- 4 Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, *et al.* Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *mycobacterium tuberculosis*; a systematic review [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(8):843-849
- 5 van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, *et al.* Predominance of a single genotype of *mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(12):3234-3238
- 6 Li WM, Wang SM, Li CY, *et al.* Molecular epidemiology of *mycobacterium tuberculosis* in China: a nationwide random survey in 2000 [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9(12):1314-1319
- 7 Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, *et al.* Global dissemination of the *mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains [J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10(1):45-52
- 8 Filliol L, Driscoll JR, van Soolingen D, *et al.* Snapshot of moving and expanding clones of *mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5):1963-1970
- 9 Singh UB, Suresh N, Bhanu NV, *et al.* Predominant tuberculosis spoligotypes, Delhi, India [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(6):1138-1142
- 10 Sola C, Filliol L, Gutierrez MC, *et al.* Spoligotype database of *mycobacterium tuberculosis*; biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3):390-396
- 11 Mallard K, McNerney R, Crampin AC, *et al.* Molecular detection of mixed infection of *mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(12):4512-4518

(收稿:2011-11-09)

(修回:2011-11-18)

不同温度、时间、IPTG 和菌种浓度对 丁肝抗原蛋白表达量的影响

丁军颖 伊 瑶 卢学新 苏秋东 田瑞光 邱 丰 毕胜利

摘 要 目的 确定以大肠杆菌表达丁肝抗原的最佳条件,为规模生产以求研发丁肝 ELISA 诊断试剂奠定基础。**方法** 在不同温度、时间、IPTG 和菌种浓度条件下,分别进行蛋白表达,取等体积样本进行 SDS-PAGE 电泳,经 Image Lab 软件分析,比较目的蛋白表达量,确定最佳表达条件。**结果** 在 25℃、29℃、33℃ 和 37℃ 条件下,蛋白表达量无统计意义的差别;在添加 IPTG 后的 1、2、3、4、5 和 6h,表达量无统计意义的差别;在以 0.25、0.5、1、2 和 4mmol/L IPTG 诱导时,表达量无统计意义的差别。当添加

基金项目:国家科技重大专项基金资助项目(2008ZX10201)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(注:丁军颖和伊瑶为共同第一作者)

通讯作者:毕胜利,研究员,电子信箱:jyd0311@126.com